①特許出頭公開

⑩ 公 開 特 許 公 報 (A) 昭63 - 264525

(5) Int Cl. 4 A 61 K 31/495 庁内整理番号 7431-4C ④公開 昭和63年(1988)11月1日

7252-4C 審査請求 未請求 発明の数 1 (全6頁)

// C 07 D 303/48

ピペラジン誘導体を含有する活性酸素産生抑制ならびに活性酸素除 去作用を有する医薬組成物

②特 願 昭62-96965

②出 願 昭62(1987)4月20日

砂発明者

田原

_ =

秋田県秋田市柳田糠塚42

⑪出 願 人 日本ケミファ株式会社

東京都千代田区岩本町2丁目2番3号

明 細 11

1. 発明の名称

ピペラジン誘導体を含有する活性酸素度生 抑制ならびに活性酸素除去作用を有する医 変組成物

2. 特許請求の範囲

一般式

(式中、Rは水常原子、低級アルキル基を示し、 nは0~3の整数を示す)で表わされるピペラジン誘導体又はその無毒性塩を有効成分として含有する活性酸素産生抑制ならびに活性酸素除去作用を有する医薬組成物。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、ピペラジン誘導体を含有する活性酸

素度生抑制ならびに活性酸素除去作用を有する医 楽組成物に関する。

安定状態の酸素(三重項酸素)がキサンチンオキンダーゼやNADPH オキンダーゼの関与により1電子を得ることでスーパーオキサイドアニオンが生成し、さらにヒドロキシラジカル、過酸化水素、次亜塩素酸のアニオン、1重項酸素などの活性酸素が生じる。

これらの活性酸素のフリーラジカルは、顆粒球の酸器作用、炎症作用、線維形成、アロキサン糖尿病、脂質過酸化、ヒスタミン遊離、DNAの破損に関与している。

従って、活性酸素の異常な産生を抑制する物質は、抗炎症剤、抗りウマチ剤、消化管疾患治療剤、 流動を硬化し抗腫症患者を必免性。 抗白内障剤、盲己免疫疾患治療剤として有用である。

そこで、本発明者らは、活性酸素産生を抑制する化合物を見い出すべく鋭度研究を行ってきた。 その結果、下記一般式 (1) で扱わされる化合物 が、優れた活性酸素除去作 用を有することを見い出し、本発明を完成した。 従って、本発明の目的は、有用な活性酸素度生 抑制ならびに活性酸素除去作用を有する医療組成 物を提供するにある。

詳細には、次の一般式 (1)

(式中、Rは水素原子、低級アルキル基を示し、nは0~3の整数を示す)で衷わされるピペラジン誘導体又はその無恋性塩を有効成分として含有する活性酸素魔生抑制ならびに活性酸素除去作用を有する医薬組成物に関する。

上記一般式 (I) で表わされる化合物は、本発明者らにより既に冠状動原結繁による実験的心筋 便塞モデルで効果を示し、心筋梗塞の予助および 治療剤として有用であることが知られている。

(式中、Rおよびnは前配と同じ意味を示して、)

一般式(I)で 表わされる化合物の具体例としては、下記のものを挙げることができる。

(2R.3R) - 3-(is) - 1 - {4 - (4 - メトキシフェニルメチル) ピペラジン-1 - イルカルボニル} - 3 - メチルブチルカルバモイル) オヰシラン-2 - カルボン酸、

(2R,3R) - 3 - ((a) - 1 - (4 - (3,4 -ジメト 中シフェニルメチル) ピペラジン-1 - イルカル ボニル) - 3 - メチルブチルカルバモイル) オキ シラン-2 - カルボン酸、

(2R.3R) - 3 - (ロ) - 3 - メチル-1 - (4 - (2.3.4-トリメトキシフェニルメチル)ピベラジ

(特開昭57-169478、特別昭58-126879)

前記一般式(1)中のRが低級アルキル基の場合の例としては、メチル基、エチル基、プロピル基、イソブチル基、n-ブチル基、 sec-ブチル基などが挙げられる。

また、無番性塩としては、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、さらには、トリアルキルアミン、ジベンジルアミン、N-低級アルキルピベリジン、α-フェネチルアミン、N-ベンジルーβ-フェネチルアミンなどの無母性塩、あるいは塩酸、臭化水素酸、ギ酸、硫酸、フマール酸、マレイン酸、酒石酸などとの無毒性塩が挙げられる。

前配一般式 (I) で表わされる化合物は、たとえば次の方法により得ることができる。

ン-1-イルカルポニル) プチルカルパモイル) オキシラン-2-カルポン酸、

(2R,3R) - 3 - (a) - 3 - メチル-1 - (4 - (3,4,5-トリメトキシフェニルメチル) ピペラジン-1 - イルカルボニル) ブチルカルバモイル) オキシラン-2 - カルボン酸、

(2R,3R) - 3 - (a) - 1 - (4 - ベンジルピペラ ジン- 1 - イルカルボニル) - 3 - メチルブチル カルパモイル] オキシラン- 2 - カルボン酸、

(25,35)-3-(s)-1- (4- (4-メトキシフェニルメチル) ピベラジン-1-イルカルボニル) -3-メチルブチルカルバモイル] オキシラン-2-カルボン酸、

(25,35)-3-{(s)-1-{4-(3,4-ジメトキシフェニルメチル) ピペラジン-1-イルカルボニル}-3-メチルプチルカルバモイル}オキシラン-2-カルボン酸、

(25.35) - 3 - ((a) - 3 - メチル-1 - (4 - (2,3,4-トリメトキシフェニルメチル) ピペラジン-1 - イルカルポニル) ブチルカルパモイル)

オキシランー2~カルボン酸、

(25.35) - 3 - ((s) - 3 - メチル-1 - (4 - (3.4.5 - トリメトキシフェニルメチル) ピペラジン-1 - イルカルボニル) ブチルカルパモイル) オキシラン-2 - カルボン酸、

(25,35) - 3 - (s) - 1 - (4 - ベンジルピペラ ジン-1 - イルカルボニル) - 3 - メチルブチル カルバモイル) オキシラン-2 - カルボン酸。

これらの化合物のエステル体または無毒性塩も 本発明の有効成分である。

本発明における一般式(1)で表わされる化合物およびその無理性塩が活性酸素産生抑制作用を有する医薬組成物として有用であることは、in vitro 及びin vivo におけるウサギ顆粒球からの活性酸素産生に及ぼす薬物の影響を観察することにより明らかになった。すなわち、被験薬物として、(2R,3R) - 3 - ((a) - 3 - メチルー 1 - (4 - (2,3,4 - トリメトキシフェニルメチル)ピペラジン-1 - イルカルボニル)ブチルカルバモイル)オキシラン-2 - カルボン酸エチルソ硫酸塩を用

また、本発明の有効成分である一般式 (1) で 衷わされる化合物はマウスにおける急性毒性試験 により、生体に対して安全性の高い物質であるこ とがわかる。

本発明における一般式 (I) の化合物およびその無 非性塩の投与量は、化合物の種類および患者の症状の程度によって異なるが、通常は 1日約10 gg ~ 1 g を患者に投与すればよい。

一般式 (1) で表わされる化合物およびその塩は、これを活性酸素産生抑制ならびに活性酸素除去作用を有する医薬組成物として用いる場合、通常は製剤的担体と必に製剤組成物の形態とされる。 担体としては、使用形態に応じた薬剤を調製するのに通常使用される地量剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等の希釈剤あるいは賦形剤が用いられる。

投与形態としては、注射剤、散剤、カプセル剤、 顆粒剤、錠剤などいずれの形態でも可能である。

錠剤の形態として用いるに際しては担体として、 例えば乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖激、 デンプン、炭酸カルシウム、結晶セルロース、ケ い、先の類粒球のformy!-methiony!-leucy!-phenylelaniae (PRLP) 刺激により発生するルミノール依存性の化学発光に及ぼす影響を観察した実験において表1で示す様に被験薬物はコントロールに比較して、活性酸素の産生を30μMで90%抑制した。

又in vivo における実験、すなわち被験薬物を 鬼に20 mm/mm神社した後得られた顆粒球を用い た実験でも、コントロールに比べ有意の抑制を示 した(変2)。

さらに、本発明における一般式(1)で扱わされる化合物が除去(Scavenging)効果、すなわち発生した活性酸素を除去する効果も有することが、ハイポキサンチンーキサンチンオキシグーゼ系で発生する活性酸素に対する薬物の影響を調べる実験(実験3)、ならびにIIェOェ-NaOC & 系における薬物の効果(実験4)を調べる実験により明らかになった。表4で示す様にHェOェ-NaOC & 系において、薬物は、30 μ H で化学発光を60%抑制した。

イ酸等の設形剤、水、エタノール、溶液、カルルギキンパトウ酸、ボン液、ゼラチンル、溶液、カルルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、カリウム等の結合剤、大変なサークンでは、大変なサークができる。更に必要によっては変にできる。

注射剤として調製される場合には、希釈剤として例えば水、エチルアルコール、プロピレングリコール、ポリオキシエチレンソルピット、ソルピタンエステル等をあげることができる。この際、等限性の溶液を調製するのに充分な量の食塩、ブドウ糖あるいはグリセリンを含有させてもよく、また、通常の溶解補助剤、緩衝剤、無症化剤、保存剤等を必要に応じて含有させてもよい。

以上に述べたように、前記一般式 (1) で表わされるピペラジン誘導体またはその無毒性塩は、優れた活性酸素産生抑制ならびに活性酸素除去作用を有し、抗炎症剤、抗リウマチ剤、消化管疾患治療剤、抗白内酸剤、自己免疫疾患治療剤として有用である。

次に本発明において、有効成分として用いられる一般式(1)の化合物およびその無毒性塩が活性酸素抑制ならびに活性酸素除去作用を有する医薬組成物として有用であり、安全性が高いことを示す試験例と一般式(1)の化合物の製剤例を示す実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。 実施例1

方法

送薬

ホルミルーメチオニルーロイシルーフェニルア ール溶液(ニーガアードNyagaard社製)に重度 テニン(FMLPと略す)、ルミノール、キサンチン た後、4 で、4 0 分間 8 0 0 g で遠心分離したオキシダーゼ(XODと略す) (0.6 U/電蛋白)、 ペレットに 1 5 5 mHの塩化アンモニウム溶液をカクラーゼ (26,000 U/電蛋白) はシグマ社製を 大赤血球を溶かした。残存する顆粒球を冷HBP 用いた。ハイボキサンチン、過酸化水素(3 0 %)、 Salineで 2 度洗浄し、同じ溶媒に再懸濁した。

次亜省素酸 (5 %溶液) は、和光純裏印製を用いた。

PMLPとルミノールは、BEPBS-Saline (5 mMの N - 2 - ヒドロキシエチルピペラジンー N ' - 2 - エタンスルホン酸pH 7. 4 で被衝化された生理の食塩水) で希釈する前にジメチルスルホキサイド (DMSO)に溶解した。反応混合物中のDMSOの最終湿度は10 μM で、この濃度は反応に影響を与えなかった。

顆粒球の個数

14

へパリンを添加した血液(70~80mℓ)を 雄性白鬼(22~3.0㎏)から得、生理食塩水中 2%デキストラン(半井化学の製)に混和した。 赤血球を室温で30分間沈澱させた。白血球に富 んだ血しょうをナトリウムメトリゾエートフィコ ール溶液(ニーガアードNyagoard社製)に重層 た後、4で、40分間800€で遠心分離した。 ペレットに155mHの塩化アンモニウム溶液を加 大砂血球を溶かした。残存する顆粒球を冷HBPBS-Salineア2度洗涤し、同じ溶媒に再解源した。

化学発光 (CLと略す) の測定

CLはルミフォトメーター(model TD4000: ラボサイエンス社製)で測定し、ミリボルトを記録した。他で含及しない限り反応混合物は2.5 m4 のCaC ℓ 。および 5 m1のKC ℓ を含有するHEPES-Salineに浮遊させた細胞浮遊液(1×10^7 細胞/m ℓ) 0.2 m ℓ ,ルミノール(最終濃度 3 0 μ N) および変物より成り、0.5 m ℓ のボリスチレン製のキュベット中で反応を行った。変物は、 $8 \times 0 \times 1$ + NaOC ℓ 系及びハイポキサンチンーXOD 系で生成したルミノール依存性のCしを抑制する能力についてもテストした。

同量 (0.1 m ℓ) の 1 0 μ M $H_{2}O_{3}$ と 3 0 μ M の ルミノールそして薬物又は穀衝液を予め混和し、 3 7 τ に温度制御したルミフォトメーターの計数 室においたの 5 1 0 μ M ρ O NaOC ℓ (0.1 m ℓ) を 注入することで活性化した。

ng) をハイポキサンチン(1 mM)、ルミノール (30 μM) そして種々の温度の変物又は緩衝液 を含むキュベットに添加した。発光量は C L 曲線 下面積により評価し、コントロールの C L と比較 して抑制率を求めた。

被酸薬物としては、 (2R,3R)-3- (a)-3-メチル-1-(4-(2,3,4-トリメトキシフェニ ルメチル) ピペラジン-1-イルカルポニル) ブ チルカルパモイル) オキシラン-2-カルボン酸 エチル% 磁酸塩を用いた。

実験 1 ルミノール依存性の化学発光生成に対す る棄物の効果 (in vitro)

類粒球 (1×10° 細胞/m ℓ) を種々の濃度の薬物と37℃で30分間インキュベートしたのち遠心分離し薬物を除くため2度HEPES-saline (4℃)で洗浄した。その後、10分間インキュベート(37℃)した後PMLP刺激により生成したCLを測定した。その結果を変1に示す。

瘦 1

東物濃度	即胡率
1 × 10-4 (N) 3 × 10-8 1 × 10-3 3 × 10-4 3 × 10-4 1 × 10-3	13.6 ± 5.1 (%) 23.1 ± 3.9 32.7 ± 3.1 90.4 ± 3.8 93.4 ± 2.3 98.5 ± 1.2

実験 2 ルミノール依存性の化学発光生成に対す る東物の効果 (In vivo)

12匹の雄性白兎(20~23kg)を無作為に 東物処型又はコントロール群に扱り分けた。 薬物 (20 m/kg) は5 m e の生理食塩水に溶かし、 5分間を要し移住した。コントロールも同様に生 理食塩水を投与した。

柱入5分後にヘパリン添加血液を得た。

顆粒球は<u>顆粒球の調製</u>で記載した方法により得た。その結果を衷2に示す。

安 3

棄物禮度 (M)	抑制率 (%)
. 0	0.00
3 × 10-*	4.63 ± 0.93
1 × 10-4	18.90 ± 2.19
3 × 10 - 4	47.21 ± 1.03
1 × 10-3	85.00 ± 0.43
3 × 10-3	98.88 ± 0.11

実験 4 H.O.+ NaOC & 系のルミノール依存性化学 発光に対する薬物の効果 (院払列果)

表 4

薬物温度(11)	抑制率 (%)
0	0.00
3 × 10 · *	13.5 ± 6.1
3 × 10 · *	24.0 ± 5.7
3 × 10 · *	60.1 ± 8.2
3 × 10 · *	85.5 ± 4.8
3 × 10 · *	94.8 ± 3.5

本発明の活性成分である一般式 (1) で衷わされる化合物は、実験1及び2から活性酸素産生抑制作用を有することが明らかとなり、また実験3及び4から発生した活性酸素の除去効果をも有す

惠 2

CLカープ下の面積	
3>10-6	薬物
11.23	6.23 -
1.91	3.13
	11.23

* p < 0.05 (Mann-Whitney U test)

実験3 ハイポキサンチン-キサンチンオキング ーゼ系のルミノール彼存性化学発光に対 する変物の効果 (除去効果)

2 0 μ 8 の XOD (4 U / m 8) をハイポキサンチン (1 m h)、ルミノール (5 0 μ h)、 確々の 変物を含むキュベットに添加した。 C L 生成はCL カーブ下の面積で評価し、 C L 反応を 1 0 0 %に 設定したコントロールと比較した。その結果を表 3 に示す。

ることが明らかとなった。

実施例2

急性毒性试験

体重 $20 \sim 2880$ ddN 系雄性マウスを用いた。 棄物は尾静脈より投与した。その結果、表 $\frac{5}{9}$ に示すように本発明の棄剤は安全性が高いことが確認 された。

5 夏 多

化合物	LDso(mg/kg i.v)	
化合物 1	374	
· / 2	MLD > 1125 ·	
7 3	345	
. * 4	MLD > 1125	

任し、化合物 1 (2R,3R) - 3 - (a) - 3 - メチル - 1 - (4 - (2,3,4 - トリメトキシフェニルメチル) ピペラジン - 1 - イルカルボニル) ブチルカルバモイル) オキシラン - 2 - カルボン酸エチル 3 硫酸塩化合物 2 (2R,3R) - 3 - (a) - 3 - メチル - 1 - (4 - (2,3,4 - トリメトキシフェニルメチル) ピペラジン - 1 - イルカ

特開昭63-264525(6)

ルボニル) ブテルカルバモイル) オキシ ラン-2-カルボン酸ナトリウム 化合物 3 (2s.3s)-3-(a)-3-メチ ル-1-(4-(2.3.4-トリメトキシフ ェニルメチル) ピペラジン-1-イルカ ルボニル) ブチルカルバモイル) オキシ ラン-2-カルボン酸エチル光硫酸塩 化合物 4 (2s.3s)-3-(a)-3-メチ ル-1-(4-(2.3.4-トリメトキシフ ェニルメチル) ピペラジン-1-イルカ ルボニル) ブチルカルバモイル) オキシ ラン-2-カルボン酸ナトリウム

実施例3 製剤例(錠剤)

1 錠(2 2 0 mg)中下記成分を含有するフィル ムコーティング錠とする。

(2R, 3R) - 3 - (s) - 3 - メチル- 1
- (4 - (2,3,4-トリメトキシフェニルメチル) ピペラジン- 1 - イルカルボニル) ブチルカルバモイル) オキシニン- 2 - カルボン酸ナトリウム 5.0 mg

乳 袋100 m枯品セルロース50 m

ステアリン酸マグネシウム 1 eg

ヒドロキシプロピルメチルセルロース 1 5 元

ヒドロキシプロピルセルロース 4m

本発明において有効成分として用いられる他の 化合物も同様な処方によりフィルムコーティング 锭とすることが可能である。

実施例4 製剤例(顆粒)

題粒1g中下記成分を含有する。

(25,35) - 3 - (a) - 3 - メチル-1
 - (4-(2,3.4-トリメトキシフェニルメチル) ピペラジン-1 - イルカルボニル) ブチルカルパモイル) オキシラン-2-カルボン酸エチル%硫酸塩

200 mg

858 5 0 0 mer

トウモロコシデンプン 300 mg

ボニル)ブチルカルバモイル)オキシ 本発明において有効成分として用いられる他の ラン・2・カルボン酸ナトリウム 50 W 化合物も同様な処方により顆粒とすることが可能

である.

実施例 5 製剂例 (注射剂)

1アンプル中下配成分を含有する。

(2R,3R)-3-(a)-3-メチル-1
- (4-(2.3.4-トリメトキシフェニルメチル) ピペラジン-1-イルカルボニル) ブチルカルバモイル) オキシラン-2-カルボン酸エチル%硫酸塩20m
上記成分に無菌蒸留水を10m2となるように

本発明において有効成分として用いられる他の 化合物も同様な処方により注射剤とすることが可 能である。

> 特許出願人 日本ケミファ株式会社 代表者 丑 山 圭 三